

## Válasz Prof. Dr. Kacskovics Imre az MTA doktora opponensi véleményére

Mindenekelőtt szeretném köszönetemet kifejezni Prof. Dr. Kacskovics Imrének az MTA doktori értekezésem igen alapos bírálataért.

Köszönöm, hogy a benyújtott értekezésemet tudományos szempontból megalapozottnak ítéli, alkalmasnak tartja az MTA doktora cím megszerzéshez és nyilvános védésre javasolta.

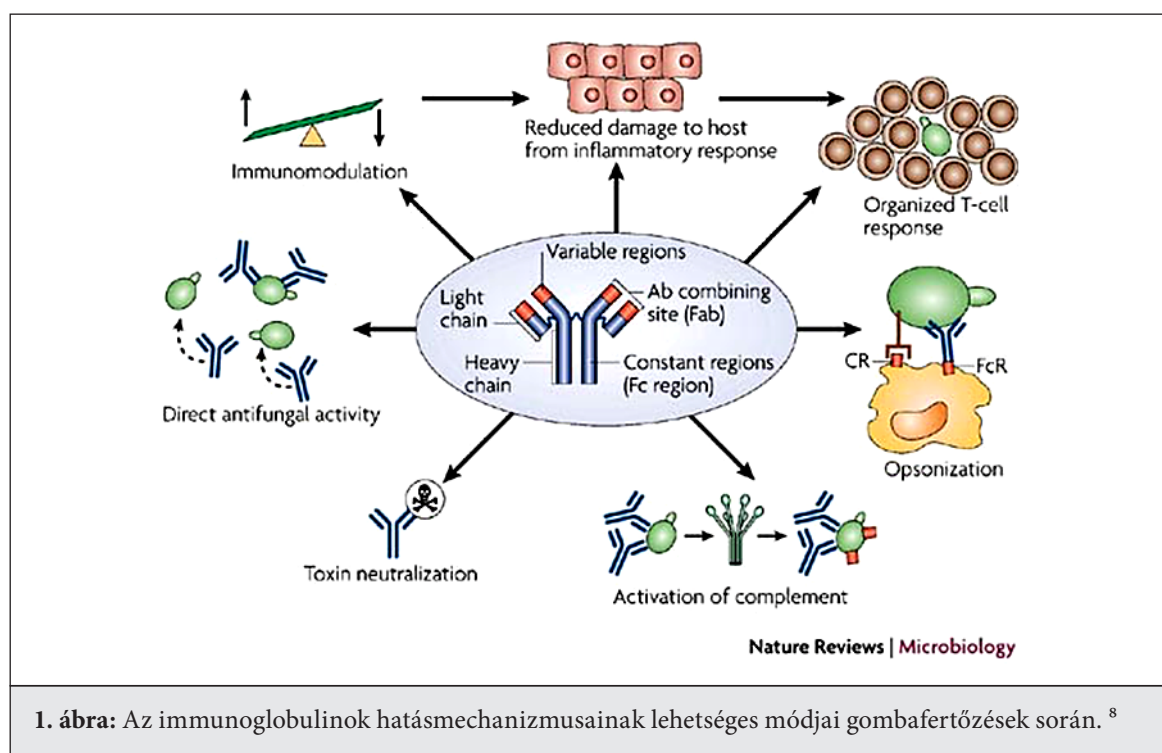
Kérdéseire a következőkben válaszolok:

*1. Ismertesse a gombák elleni humorális immunválasz főbb lépéseit, hatékonyságát, a gombák elleni vakcinák, passzív immunterápiás beavatkozások fejlesztésének lehetőségeit.*

Az utóbbi időben egyre több információ áll rendelkezésünkre a humorális immunválasz szerepéről gombafertőzések elleni gazdaválasz során, ennek ellenére még mindig számos vitás kérdés vár tisztázásra. Korai megfigyelések arra utaltak, hogy az antitestek szerepe a gomba elleni immunválaszban elhanyagolható<sup>1-3</sup>. A monoklonális ellenanyagok használatának elterjedése azonban rávilágított az immunoglobulinok protektív hatására gombafertőzések során. Ettől kezdve a B sejtek és az általuk termelt ellenanyagok szerepe, egyre inkább nyilvánvalóvá vált számos gombapatógénnel (mint pl: *C. neoformans*, *C. albicans*, *H. capsulatum*, *Pneumocystis* fajok) szembeni immunválasz során. Az immunoglobulinok klinikai jelentősége azzal is bizonyítottá vált, hogy azok a páciensek akik valamilyen B sejteket vagy azok funkcióját érintő defektusban szenvednek (pl. X-kötött hiper IgM szindróma, hipogammaglobulinémia vagy az IgG2 deficiencia<sup>4</sup>) érzékenyebbek bizonyos gombák okozta fertőzésre pl. cryptococcosis-ra. Az antitestek protektív hatásukat elsősorban a gombák sejtfalában található antigéneket célozva fejtik ki, ilyen gomba-antigének pl. a  $\beta$ -glükán (*A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. neoformans*), agglutininszerű szekvencia 3 (ALS3) (*C. albicans*) glükuronoxilomannán (*C. neoformans*) és hősok fehérje 60 (Hsp60) (*H. capsulatum*)<sup>5</sup>. A gombaszpecifikus immunoglobulinok hatásmechanizmusa közvetlen vagy közvetett lehet (1. ábra), közvetlen hatás alatt értjük azt, ha az immunoglobulin gátolja a gomba növekedését az antigénhez történő kötődést követően. Bizonyos esetekben ez a kötés akár fungicid hatású is

lehet amelyet *C. albicans*, *C. neoformans* és *A. fumigatus* esetében is leírtak<sup>4</sup>. Ismert az is, hogy az antitestek kapcsolódása a gombasejtek felszínéhez megváltoztatja azok génexpressziós mintázatát és metabolizmusát, amelyek elősegíthetik az immunrendszer általi hatékonyabb eliminációt<sup>6</sup>. Indirekt mód lehet például az immunoglobulinok által aktivált effektor sejtek gombaölő hatása, vagy annak hatékonyságának növelése.

Indirekt hatás továbbá az opsonizáció és ezáltal a komplement rendszer aktivációja, illetve az ellenanyag közvetített sejt citotoxicitás (ADCC) fokozása. A legújabb kutatások alapján tudjuk, hogy a *C. albicans* képes gazda sejteket károsító toxin az ún. candidalizin termelésére<sup>7</sup>. Így nem zárható ki az az indirekt hatás sem, ahol az antitestek neutralizáló hatást fejthetnek ki a gazdasejteket károsító toxin molekulákra. Ennek bizonyítása azonban további vizsgálatokat igényel.



Gombafertőzések esetében az antitestek alkalmazása terápiás célra egyelőre számos megválaszolásra váró kérdést vet fel és olykor ellentmondásos eredményekről számolnak be kutatók. Ismert például, hogy egér cryptococcosis modellben az anti-kapszula IgG1 antitestek adása csökkenti az IFN- $\gamma$  termelődést és fokozza az IL-10 termelődését, mindemellett azonban a kezelt egerek túlélése javul<sup>9</sup>. A szerzők magyarázata szerint a gyulladásos válasz gátlása a fertőzés gyorsabb kontrollját teszi lehetővé, továbbá

csökkenti a gazdasejtek károsodását. Ennek a hatásnak a pontos mechanizmusa jelenleg nem ismert, egy lehetséges magyarázat a komplement rendszer gátlása lehet, az erősen galaktozilált antitestek által. Karsten és mtsai<sup>10</sup> kimutatták, hogy az IgG1 molekulák N-glükán galaktozilációja elősegíti a gátló Fc  $\gamma$ RIIB IgG receptor és a Dectin-1 kölcsönhatását, amelynek következtében a komplement rendszer aktivációja illetve annak hatásai csökkenek (főként a C5a receptor gátlásán keresztül). Ezzel éles ellentétben Nosanchuk és mtsai<sup>11</sup> igazolták, hogy a *H. capsulatum* hiszton-szerű fehérjéjével a H2B-vel szemben termeltetett antitestek adminisztrációja jelentősen növeli a kezelt egerék túlélését azáltal, hogy a gyulladásos folyamatokat segítő Th1-es citokinek termelése fokozódik és így az alveoláris makrofágok gombaölő képessége növekszik. A fenti két példában tehát az antitestek eltérő módon, de mindkét esetben a gyulladásos válasz szabályozásával fejtették ki hatásukat, ez arra utal hogy egy általános érvényű minden gombapatogénnel szemben hatásos antitest-terápia nagyon valószínűtlen, ugyanakkor ezek az eredmények alátámasztják a humorális immunválasz szerepét gombafertőzések során. A gombák okozta infekciók elleni vakcinák kérdése hosszú ideje foglalkoztatta a szakterület kutatóit. Jelenleg egyetlen gombák ellen használható vakcina sem áll rendelkezésünkre és sok vita folyik arról, hogy a vakcinák valódi előnyt jelentenének-e gombafertőzések esetén. Az egyik legnagyobb kihívás az, hogy az ilyen típusú infekciók elsősorban immunválaszukban károsodott páciensek körében gyakoriak, ahol a vakcinák használata számos problémát vet fel. Továbbá a patogén gombák nagyrésze gyakra megtalálható a normal mikrobiális közösség részeként, így egy általános vakcina pl. *C. parapsilosis* ellen felvetheti az autoimmun komplikációk lehetőségét. Van azonban egy további sokkal inkább társadalmi vonatkozásokat jelentő kérdés, amely a sajnálatos módon egyre inkább terjedő vakcina ellenesség problémája. Ennek ellenére számos próbálkozás van gomba-vakcinák kifejlesztésére. A leginkább előrehaladott állapotban két *Candida* ellenes rekombináns fehérje vakcina kifejlesztése áll, ezek ugyanis már klinikai kipróbálás fázisban vannak. Az egyik az ún. NDV-3 (NovaDigm, Grand Forks, ND), amely a gombasejtek inváziós képességével összefüggésbe hozott Als3p fehérjét tartalmazza. A kezdeti eredmények biztatóak, a vakcina biztonságosnak bizonyult a klinikai I-es kísérletek során<sup>12</sup>. A másik Pevion Biotech (Bern, Svájc) által fejlesztett virosome-alapú vakcina elsősorban vaginális candidiasis ellen véd és a *C. albicans* egyik szekretált proteinázát a Sap2-t célozza. A vakcina klinikai hatékonyságáról egyelőre nincsenek nyilvános adatok, azonban személyes információk alapján (Antonio Cassone és munkatársai), a klinka I-es kísérletek folyamatban vannak.

2. Terveznek-e olyan ellenanyagot fejleszteni, amely SAPP1 fehérjét neutralizálja, ill. felmerült-e egy ilyen antitest terápia alkalmazása?

A kérdésre a rövid válaszom az hogy igen. Prágai kollaborátorunk mind a Sapp1 mind a Sapp2 fehérjék esetében már rendelkezésünkre bocsátotta az immunizáláshoz szükséges mennyiségű tisztított fehérjét. A dolgozatban bemutatott munka folytatásaként a *C. parapsilosis* szekretált proteázainak komplement komponensekre gyakorolt hatását kívánjuk vizsgálni. Ismert ugyanis, hogy *C. albicans* esetében a szekretált proteázok képesek több komplement fehérjét is hasítani (C3b, C4b, C5) és ezáltal a immunválasz hatékonyságának csökkenteni. Józsi Mihály munkacsoportja mutatta ki<sup>13</sup>, hogy a *C. albicans* Sapp2 fehérjéje képes a H faktort hasítani és ezáltal a makrofágok aktivációját csökkenteni. A gyulladásos citokinek termelésének és a fagocitózis hatékonyságának csökkenése a CR3 (CD11b/CD18) és CR4 (CD11c/CD18) receptorok Sap2 általi hasításával tovább csökken. *C. parapsilosis* esetében nem áll rendelkezésünkre adat a komplement rendszer fehérjéivel történő interakcióról, azonban a csoportunkban létrehozott ún. „sapp-negatív” mutáns, amely nem termel szekretált proteinázt, kitűnő eszköz lehet a *C. parapsilosis* proteinázok szerepének részletesebb tanulmányozására. Kutatócsoportunk kiemelten foglalkozik ezzel a témával és reményeim szerint hamarosan jelentősen bővülnek ismereteink a *C. parapsilosis* proteázainak virulenciában betöltött szerepéről, pontos hatásmechanizmusok felderítése által.

3. Eredményei rávilágítanak a T-sejtek jelentőségére a *Candida* fajok patogén hatásainak kivédésében. Az immunterápiák egyik jelenkori nagy eredménye az ún. „check-point” molekulák szabályozása egyes tumoros és autoimmun betegségekben. Ezek a gyógyszerek a gátolt, de jelenlévő antigen-specifikus T-sejteket reaktiválják, vagy éppenséggel gátolják. Mit gondol, lehet-e szerepe ezeknek a terápiáknak a súlyos gombák által okozott szövődmények kezelésében?

Egy közelmúltbeli összefoglalóban Deo és Gottlieb részletesen tárgyalta a gombafertőzések során alkalmazható T sejteket fehasználó vagy azok működésével összefüggésbe hozható immunterápiás lehetőségeket<sup>14</sup>. Ezek közé tartozik a IFN $\gamma$  terápia krónikus granulomatózis, *Cryptococcus* meningitis és transzplantációval kapcsolatos gombás megbetegedések esetén; adoptív sejt terápiák antigén-specifikus T-sejtek segítségével

és a gomba antigén-kezelt dendritikus sejtek felhasználásával invazív aspergillosis és / vagy candidiasis esetén.

A 2000-es évektől kezdve egyre több közlemény bizonyította a T sejtek alapvető szerepét gombafertőzések elleni védekezés során. Saját munkánk alapján is tudjuk, hogy a hatékony immunválasz egyik markáns komponense a T sejtek által termelt citokinek és azok immunválaszt moduláló hatása. Egy korábbi, a dolgozatban részletesen nem tárgyalt munkánk épp a bírálóm kérdésével kapcsolatos problémával foglalkozik. Az Einstein Egyetemen Dr. Lázár-Molnár Eszter és Prof. Stanley Nathenson† közreműködésével kimutattuk, hogy a PD1 – PD-L1 útvonalnak meghatározó szerepe van *H. capsulatum* fertőzések során. Eredményeink alapján a PD1 -/- egerek letális dózissal történő fertőzést követően is túléltek, annak ellenére, hogy a disszemináció hasonló mértékű volt a fertőzés kezdeti szakaszában, mint a vad típusú egerek esetében. A knock out egerek azonban sokkal hatékonyabban voltak képesek eliminálni a kórokozót a szervekből. Megállapítottuk, hogy a *H. capsulatum* fertőzés során a fagocitáló makrofágok esetében a sejtfelszíni PD-L1 molekula expressziója megnövekszik, ezáltal a T sejtek aktivációja csökken, illetve a már aktivált T sejtek kevésbé képesek proliferálni. Bizonyítottuk továbbá azt is, hogy a PD1 - PD-L1 útvonal blokkolása specifikus antitestek által, jelentősen növeli a kezelt állatok túlélését. Feltételezésünk szerint a gombafertőzést követően a gátló PD1 útvonal aktiválódik, csökkentve ezáltal a T sejtet immunválaszt és elősegítve a gomba túlélését a gazdaszervezetben<sup>15</sup>. 2016 decemberében megjelent publikáció alapján tudjuk, hogy a fenti útvonal blokkolásával kapcsolatos kísérleteket végeztek *Cryptococcus* fertőzések során, ahol a T sejtet válasz aktiválásának növekedését mérték és javult a fertőzött állatok túlélése is<sup>16</sup>. A fentiek alapján tehát az a véleményem, hogy mindenképpen fontosak az ilyen irányú kutatások és bizonyos invazív gombafertőzések esetén lehetségesnek gondolom a molekuláris célpontokat felhasználó immunterápiák jövőbeni alkalmazását.

Végezetül még egyszer szeretném megköszönni Prof. Dr. Kacs Kovics Imrének dolgozatom alapos bírálatát.

## Irodalom:

1. Hurd, R.C. & Drake, C.H. *Candida albicans* infections in actively and passively immunized animals. *Mycopathologia et mycologia applicata* **6**, 290-297 (1953).
2. Goren, M.B. Experimental murine cryptococcosis: effect of hyperimmunization to capsular polysaccharide. *Journal of immunology* **98**, 914-922 (1967).
3. Diamond, R.D. Antibody-dependent killing of *Cryptococcus neoformans* by human peripheral blood mononuclear cells. *Nature* **247**, 148-150 (1974).
4. Verma, A., Wuthrich, M., Deepe, G. & Klein, B. Adaptive immunity to fungi. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **5**, a019612 (2014).
5. Casadevall, A. & Pirofski, L.A. Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and therapy of fungal diseases. *Cell host & microbe* **11**, 447-456 (2012).
6. McClelland, E.E., Nicola, A.M., Prados-Rosales, R. & Casadevall, A. Ab binding alters gene expression in *Cryptococcus neoformans* and directly modulates fungal metabolism. *The Journal of clinical investigation* **120**, 1355-1361 (2010).
7. Moyes, D.L. *et al.* Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature* **532**, 64-68 (2016).
8. Cutler, J.E., Deepe, G.S., Jr. & Klein, B.S. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold. *Nature reviews. Microbiology* **5**, 13-28 (2007).
9. Feldmesser, M., Mednick, A. & Casadevall, A. Antibody-mediated protection in murine *Cryptococcus neoformans* infection is associated with pleiotropic effects on cytokine and leukocyte responses. *Infection and immunity* **70**, 1571-1580 (2002).
10. Karsten, C.M. *et al.* Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nature medicine* **18**, 1401-1406 (2012).
11. Nosanchuk, J.D., Steenbergen, J.N., Shi, L., Deepe, G.S., Jr. & Casadevall, A. Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. *The Journal of clinical investigation* **112**, 1164-1175 (2003).



12. Schmidt, C.S. *et al.* NDV-3, a recombinant alum-adjuvanted vaccine for *Candida* and *Staphylococcus aureus*, is safe and immunogenic in healthy adults. *Vaccine* **30**, 7594-7600 (2012).
13. Svoboda, E. *et al.* Secreted aspartic protease 2 of *Candida albicans* inactivates factor H and the macrophage factor H-receptors CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18). *Immunology letters* **168**, 13-21 (2015).
14. Deo, S.S. & Gottlieb, D.J. Adoptive T-cell therapy for fungal infections in haematology patients. *Clinical & translational immunology* **4**, e40 (2015).
15. Lazar-Molnar, E. *et al.* The PD-1/PD-L costimulatory pathway critically affects host resistance to the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 2658-2663 (2008).
16. Roussey, J.A., Olszewski, M.A. & Osterholzer, J.J. Immunoregulation in Fungal Diseases. *Microorganisms* **4** (2016).